

2) 国内学会

Morita K, Inoue S, Ishikawa K, Fuke I. Development and evaluation of newly developed WN vaccine. 第4回あわじしま感染症・免疫フォーラム(平成16年8月30日~9月2日、あわじ夢舞台、兵庫)

伊藤美佳子、高崎智彦、向井 三郎、倉根一郎. サルにおけるデングウイルス感染増強抗体の解析. 第52回日本ウイルス学会総会(横浜市) 2004/11/21-23

田島 茂、伊藤美佳子、高崎智彦、倉根一郎. デングウイルス1型完全長 cDNA クロター) 2004/12/4

馬紹平、森田公一、牧野芳大、小河正雄: 北部九州で分離された日本脳炎ウイルス(GIII)株の3' NCRに存在する欠損の variation、第39回日本脳炎ウイルス生態学研究会(平成16年6月17~18日、神戸)

井上真吾、マリア T. アロンゾ、フローレンシオ P. タデナ、ロナルド R. マティアス、フィリピナス F. ナティビダド、森田公一: フィリピンにおける日本脳炎発生の季節性について、第39回日本脳炎ウイルス生態学研究会(平成16年6月17~18日、神戸)

黒澤八重、山本晃、木城きくか、中山幹男、小川哲郎、井上真吾、高崎智彦、森田公一、倉根一郎: ハイドロキシアパタイト-ナイロン複合ビーズを用いた抗デングウイルス IgMの検出、第39回日本脳炎ウイルス生態

一の作成およびウイルス産生系の確立. 第52回日本ウイルス学会総会(横浜市) 2004/11/21-23

名和優、高崎智彦、赤塚俊隆、伊藤美佳子、倉根一郎. デング血清診断における血清中 IgA 抗体検出と有用性の検討. 第52回日本ウイルス学会総会(横浜市) 2004/11/21-23

高崎智彦. わが国におけるアルボウイルス感染症の現状. 第7回近畿熱帯医学研究会(京都市; 京都大学東南アジア研究センター) 平成16年12月4日

マンモハン パリダ、堀岡宏平、石田裕之、井上真吾、森田公一: リアルタイムRT-LAMP法を用いたデングウイルス各血清型別迅速診断法の開発、第39回日本脳炎ウイルス生態学研究会(平成16年6月17~18日、神戸)

馬紹平、森田公一、只野昌之、牧野芳大、小河正雄: 日本で伝播している日本脳炎ウイルスの変遷 1935-2002、第41回日本ウイルス学会九州支部総会(平成16年9月3、4日、福岡)

Wei-Feng Tang, Yuki Eshita, Masayuki Tadano, Kouichi Morita, Yoshihiro Makino, Molecular basis for adaptation of a dengue type-4/Japanese encephalitis chimeric virus to Vero cells. 第41回日本ウイルス学会九州支部総会(平成16年9月3、4日、福岡)

馬紹平、森田公一、只野昌之、小河正雄：
日本で伝播している日本脳炎ウイルスの変遷 1935-2002、第 32 回日本熱帯医学会総会（平成 16 年 10 月 15-16 日、東京）

井上真吾、Alonzo Maria Tet, Tadena florencio P., Matias Ronald R., Natividad Filipinas F. 森田公一：フィリピンにおける日本脳炎について、第32回日本熱帯医学会総会（平成16年10月15-16日、東京）

菊地三穂子、Huong Vu Thi Que, Ngu Vu Thien Thu, Tham Vo Dinh, Dat Tran Van, Ha Do Quang, 森田公一、平山謙二：デング出血熱の重症化を決定する宿主要因の解析、第32回日本熱帯医学会総会（平成16年10月15-16日、東京）

Islam Mohammed A., Ahmed Muzahed U., Begum Nasima, Chowdhury Naseem A., Khan Afjal H., Parquet Maria del C., Bipolo Sophie, Hasebe Futoshi, Suzuki Yasuo, Morita Kouichi : Status of Currently Circulating Dengue Virus Responsible for the Epidemic in Bangladesh in the Year 2002, 第32回日本熱帯医学会総会（平成16年10月15-16日、東京）

Parida Manmohan, Minekawa Harumi, Notomi Tsugunori, Inoue Shingo, Hasebe Futoshi, Morita Kouichi : Real-Time Reverse Transcription Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay as a Rapid Diagnostic Tool for Emerging Viruses, 第32回日本熱帯医学会総会（平成16年10月15-16日、東京）

名和優、赤塚俊隆、高崎智彦、倉根一郎、森田公一、只野昌之：日本脳炎ウイルス Edomain I および II の境界領域のエピトープに対する中和単クローン抗体は、弱酸性条件での分子構造変化を制御した。第52回日本ウイルス学会（平成16年11月21-23日、横浜）

馬紹平、森田公一、只野昌之、牧野芳大：日本で伝播している日本脳炎ウイルスの変遷1935-2002。第52回日本ウイルス学会（平成16年11月21-23日、横浜）

Parida Manmohan, Inoue Shingo, Morita Kouichi : Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes Real-Time Reverse Transcription Loop Mediated Isothermal Amplification. 第52回日本ウイルス学会（平成16年11月21-23日、横浜）

石川 知弘、奴久妻 聡一、高崎 智彦、倉根 一郎、小西 英二：ウエストナイルウイルス prM/E 遺伝子組込み DNA ワクチンの作製とマウスにおける評価。第 39 回日本脳炎ウイルス生態学研究会（2004）。

井本 淳一、小杉 紗織、小西 英二：デング 4 価 DNA ワクチンの作製とマウスにおける免疫原性。第 39 回日本脳炎ウイルス生態学研究会（2004）。

正田 瑞恵、近藤 高志、小西 英二：栗東及び美浦におけるウマの日本脳炎ウイルス NS1 抗体レベルの経年変化。第 39 回日本脳炎ウイルス生態学研究会（2004）。

小杉紗織、奴久妻聡一、小西英二：デング2型ウイルスがマウスに誘導する抗体のクローナルレベルにおける解析：抗体可変領域の推定アミノ酸配列における個体差。第39回日本脳炎ウイルス生態学研究会(2004)。

小西 英二：日本脳炎ウイルス自然感染率：ワクチン不要論は正しいか？第45回日本臨床ウイルス学会（2004）。

山中 敦史、小杉 紗織、小西 英二：デング免疫マウスを用いて作製したモノクローナル抗体のキャラクタライゼーション。第11回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会（2004）。

石川知弘、小西英二：日本脳炎ウイルスサブゲノミックレプリコンの構築。第52回日本ウイルス学会学術集会・総会（2004）。

正田瑞恵、新井 智、多屋馨子、岡部信彦、小西英二：近年の日本におけるヒトの日本脳炎ウイルス自然感染状況。第52回日本ウイルス学会学術集会・総会（2004）。

小杉 紗織、井本 淳一、小西 英二：デング4価 DNA ワクチンのマウスにおける抗体誘導能。第52回日本ウイルス学会学術集会・総会（2004）。

小西 英二、正田 瑞恵、近藤 高志：日本脳炎ウイルスNS1抗体レベルの経年変化：茨城県及び滋賀県におけるウマを対象とした調査。第52回日本ウイルス学会学術集会・総会（2004）。

高崎智彦。わが国におけるアルボウイル

ス感染症の現状。第7回近畿熱帯医学研究会（京都市；京都大学東南アジア研究センター）2004/12/4

伊澤晴彦、星野啓太、佐々木年則、沢辺京子、津田良夫、倉橋 弘、高崎智彦、吉田政弘、渡辺 護、小林睦夫。本邦生息蚊類のウイルス保有状況調査。第38回日本脳炎ウイルス生態学研究会（神戸市）2004年6月

小滝 徹、高崎智彦、倉根一郎。気候ジャンプと日本脳炎ブタHI抗体かとの相関。第38回日本脳炎ウイルス生態学研究会（神戸市）2004年6月

桑山 勝、伊藤美佳子、高尾信一、島津幸枝、福田伸治、宮崎佳都夫、倉根一郎、高崎智彦。小児無菌性髄膜炎患者からの日本脳炎ウイルス遺伝子の検出。第38回日本脳炎ウイルス生態学研究会（神戸市）2004年6月

高崎智彦。話題の感染症ーウエストナイル熱を中心にー。第9回日本神経感染症学会。（弘前市）10/8-9/2004

桑山 勝、伊藤美佳子、高尾信一、島津幸枝、福田伸治、宮崎佳都夫、倉根一郎、高崎智彦。小児髄膜炎患者からの日本脳炎ウイルス遺伝子検出。第52回日本ウイルス学会総会（横浜市）2004/11/21-23

佐々木年則、澤邊京子、伊澤晴彦、江下優樹、伊藤美佳子、高崎智彦、倉根一郎、小林睦生。免疫クロマトグラフィーによる蚊からのウエストナイルウイルスの検出。

第 38 回日本脳炎ウイルス生態学研究会
5/15-16/2003 (小樽市)

佐藤利明、斎藤隆行、古屋由美子、今井光
信、宮澤真紀、高崎智彦、倉根一郎、ウエ
ストナイルウイルスの遺伝子検査—感染研
マニユアルの死亡カラスへの応用事例—
第 38 回日本脳炎ウイルス生態学研究会
5/15-16/2003 (小樽市)

高崎智彦。「ウエストナイルウイルス感染
症」 新興疾病・人獣共通感染症に関する
国際ワークショップ 6/19/2003 (東京都)
高崎智彦。「ウエストナイルウイルス感染
症について」 第 2 回関西感染症フォーラ
ム 6/21/2003 (大阪市)

高崎智彦。フラビウイルス感染症およびそ
の流行における鳥類の役割。平成 15 年秋
季全国鶏病技術研修会 (広島市) 11/6/2003

高崎智彦。話題の感染症—ウエストナイ
ル熱を中心に—。第 19 回日本環境感染症
学会。(横浜市) 2/20/2004

小林陸生：ウエストナイルウイルスの伝播
と媒介蚊の役割。シンポジウム” ウエス
トナイルウイルス感染症の疫学” —現状と対
策—, 第 16 回獣医疫学会学術集会シンポジ
ウム, 16 年 4 月 3 日, 藤沢市。

2

Sudipta Roychoudhury, 伊澤晴彦, 澤邊京
子, 佐々木年則, 小林陸生：ヤブカ寄生性
原虫 *Ascogregarina culicis* のリボソーム
DNA および熱ショック蛋白質 70 遺伝子のク
ローニング。第 56 回日本衛生動物学会大会,
16 年 4 月 5-7 日, 福井市。

斉藤康秀, 服部順子, 茅根士郎, 二瓶直子,
津田良夫, 倉橋 弘, 小林陸生：蚊成虫捕
獲トラップのための二酸化炭素源：酵母に
よる生物発酵法。第 56 回日本衛生動物学会
大会, 16 年 4 月 5-7 日, 福井市。

津田良夫, 倉橋 弘, 林 利彦, 葛西真治,
伊澤晴彦, 佐々木年則, 澤邊京子, 冨田隆
史, 二瓶直子, 小林陸生：都市域における
ドライアイストラップによる蚊類の発生状
況調査。第 56 回日本衛生動物学会大会, 16
年 4 月 5-7 日, 福井市

倉橋 弘, 津田良夫, 林 利彦, 葛西真治,
伊澤晴彦, 佐々木年則, 澤邊京子, 冨田隆
史, 二瓶直子, 小林陸生：ドライアイスト
ラップで捕集された都市域の昆虫類。第 56
回日本衛生動物学会大会, 16 年 4 月 5-7 日,
福井市。

小林陸生。伊澤晴彦, 佐々木年則, 二瓶直
子, 澤邊京子, 津田良夫：北海道能取湖に
おけるドライアイストラップによる蚊の捕
集：設置場所と捕集数に関する考察。第 56
回日本衛生動物学会大会, 16 年 4 月 5-7 日,
福井市。

小林陸生, 二瓶直子, 栗原 毅：東北地方
におけるヒトスジシマカの分布域拡大と関
連する要因。第 56 回日本衛生動物学会大会,
16 年 4 月 5-7 日, 福井市。

吉田政弘, 山下敏夫, 小原豊美, 小林陸生：
都市域における蚊の発生状況 (2003 年)。
第 56 回日本衛生動物学会大会, 16 年 4 月
5-7 日, 福井市。

富田隆史, 石川 剛, 正野俊夫, 津田良夫, 小林睦生, 葛西真治: 首都圏を中心としたウエストナイル熱媒介蚊の殺虫剤感受性試験: ピレスロイド剤抵抗性アカイエカ群の確認. 第 56 回日本衛生動物学会大会, 16 年 4 月 5-7 日, 福井市.

伊澤晴彦, 澤邊京子, 佐々木年則, 津田良夫, 倉橋 弘, 高崎智彦, 吉田政弘, 渡辺護, 小林睦生: 本邦野外捕集蚊からのアルボウイルスの分離. 第 56 回日本衛生動物学会大会, 16 年 4 月 5-7 日, 福井市.

比嘉由紀子, 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 二瓶直子, 澤邊京子, 津田良夫, 小林睦生: 北海道東部におけるドライアイストラップによる蚊の捕集. 第 56 回日本衛生動物学会東日本支部大会, 16 年 10 月 25 日, 川崎市.

小林睦生, Sudipta Roychoudhury, 比嘉由紀子, 二瓶直子, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 澤邊京子, 津田良夫: 日本産ヤブカ類幼虫に新たに認められた *Ascogregaria* spp. について. 第 56 回日本衛生動物学会東日本支部大会, 16 年 10 月 25 日, 川崎市.

葛西真治, 駒形 修, 正野俊夫, 富田隆史, 澤邊京子, 比嘉由紀子, 津田良夫, 小林睦生, 元木 貢, 高橋朋也, 谷川 力, 吉田政弘: 日本産アカイエカとチカイエカの分子生物学的判別法. 第 56 回日本衛生動物学会東日本支部大会, 16 年 10 月 25 日, 川崎市.

江下優樹 (2004): 蚊媒介性疾患としてのア

ルボウイルス症. 第 28 回日本熱帯医学会九州支部大会. 2004 年 1 月 31 日 (土) - 2 月 1 日 (日) 大分

江下優樹, Srisawat Raweevan, 安西三郎, 多森直樹, Narumon Komalamisra, Somjai Leemingsawat, Yupha Rongsriyam, 牛島廣治 (2004): タイ国の Dengue 熱流行地域で採集した媒介蚊からの Dengue ウイルスゲノム検出. 第 19 回日本国際保健医療学会東日本地方会. 2004 年 2 月 28 日 東京

江下優樹, Srisawat Raweevan, 多森直樹, 安西三郎, 高崎智彦, 内田幸憲, 高島郁夫, 倉根一郎 (2004): 蚊類のアルボウイルス媒介能 (8) 日本産 *Aedes flavopictus miyarai* と *Aedes galloisi* の Dengue ウイルス感受性. 第 56 回日本衛生動物学会大会. 2004 年 4 月 5, 6, 7 日, 福井県国際交流会館

Tang, O. Wei-feng, Eshita, Y., Tadano, M, Morita, K. and Makino Y. (2004): Molecular basis for adaptation of a dengue type-4/Japanese encephalitis chimeric virus to vero cells. ウイルス学会九州支部総会. 第 41 回日本ウイルス学会九州支部総会, 平成 16 年 9 月 3-4 日

江下優樹, 安西三郎, 多森直樹, 東原絢子, Hamady Dieng, Srisawat Raweevan, Narumon Komalamisra, Somjai Leemingsawat, Yupha Rongsriyam, 牛島廣治 (2004): タイ国 Dengue 熱流行地でのウイルス保有蚊調査. 第 57 回日本寄生虫学会南日本支部大会・第 54 回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会 2004 年 10 月 22-23 日, 北九州市

Hamady Dieng, Naoki Tamori, Junko Higashihara, Saburo Anzai and Yuki Eshita (2004): Study of midgut protein profiles in *Aedes albopictus* with reference to some ecological and physiological attributes. 第57回日本寄生虫学会南日本支部大会・第54回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会。2004年10月22-23日、北九州市

江下優樹 (2004): 再興感染症としてのデング熱とマラリア: 特にそれら媒介蚊について。第36回日本小児感染症学会、第20回ICD (Infectious Control Doctor) 講習会 (国際感染症と病院対策)。2004年11月12-13日、16:00-18:00, 東京

竹上勉、村上学、奴久妻聡一。日本脳炎ウイルスゲノムRNA3'末端UTRの生物学的役割: 持続感染との関わり。第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2004年11月21日-23日。

村上学、奴久妻聡一、竹上勉。RNAiによる日本脳炎ウイルス感染増殖の制御。第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2004年11月21日-23日。

田福宣治, 新垣 榮, 新川 武, 只野昌之, 森 直樹: 金コロイドを用いたウエストナイルウイルスDNAワクチンの効果。第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2004年11月21日-23日。

前田秋彦、前田潤子、高木弘隆、荻野倫子、倉根一郎、堀内基広。無血清培養Vero E6

細胞でのウエストナイルウイルスの増殖。第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2004年11月21日-23日。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 特許

「デングウイルスのLAMP法を用いた検出方法」出願者: 森田公一

(2) 実用新案

なし

(3) その他

なし

別紙 5

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻	ページ	出版年
Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S.	Possible horizontal transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus from a mother to her child.	Japanese Journal of Infectious Diseases	57	55-57	2004
Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S.	Recombinant nucleoprotein-based serological diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections.	Journal of Medical Virology	75	295-299	2005
Ernawati Dewi Beti, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane.	In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection.	Journal of Virological Methods.	121	171-180	2004
Mikako Ito, Tomohiko Takasaki, Ken-Ichiro Yamada, Reiko Nerome, Shigeru Tajima and Ichiro Kurane.	Development and Evaluation of Fluorogenic Reverse Transcriptase PCR (TaqMan RT-PCR) Assays for Dengue Virus Types 1-4.	Journal of Clinical Microbiology	42	5935-5937	2004
Masaru Nawa, Tomohiko Takasaki, Mikako Ito, Ichiro Kurane, Toshitaka Akatsuka.	Detection of Dengue Virus Serotype-specific IgM by IgM capture ELISA in the presence of sodium thiocyanate (NaSCN).	Dengue Bulletin (WHO)	28	In press	2004
Kunishige M, Mitsui T, Leong HN, Takasaki T, Kurane I, Mihara A, Matsumoto T.	Preferential gray matter involvement in dengue myelitis.	Neurology	63	1980-1981	2004

Edward Gitau Matumbi Mathenge, Maria del Carmen Parquet, Yasutomo Funakoshi, Seiji Houhara, Pooi Fong Wong, Akitoyo Ichinose, Futoshi Hasebe, Shingo Inoue, Kouichi Morita.	Fusion PCR generated Japanese encephalitis virus/dengue 4 virus chimera exhibits lack of neuroinvasiveness, attenuated neurovirulence, and a dual-flavi immune response in mice.	Journal of General Virology	85	2503-2513	2004
Nga PT., Parquet MC, Cuong VD, Ma S-P., Hasebe F, Inoue S, Makino Y, Takagi M, Nam VS and Morita K.	Shift in JEV genotype circulating in northern Vietnam: Implication for frequent introductions of JEV from Southeast Asia to East Asia.	Journal of General Virology	85	1625-1631	2004
Eiji Konishi, Mizue Shoda, Naoko Ajiro and Takashi Kondo	Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantifying antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein to detect subclinical infections in vaccinated horses.	Journal of Clinical Microbiology	42	5087-5093	2004
Jun-ichi Imoto and Eiji Konishi	Needle-free jet injection of a mixture of Japanese encephalitis DNA and protein vaccines: a strategy to effectively enhance immunogenicity of the DNA vaccine in a murine model.	Viral Immunology	18	206-213	2005

Masaru Kuwayama, Mikako Ito, Shinichi Takao, Yukie Shimazu, Shinji Fukuda, Kazuo Miyazaki, Ichiro Kurane, Tomohiko Takasaki.	Detection of Japanese encephalitis virus genome in cerebrospinal fluids from meningitis patients in Japan.	Emerging Infectious Diseases	11	471-473	2005
Anzai, S., Fukuda, M., Otsuka, Y., and Eshita, Y.	Nucleotide sequence and phylogenetic analyses of dengue type 2 virus isolated in the Dominican Republic	Virus genes	29	219-227	2004
田部井由紀子、吉田靖 子、長谷川道弥、長島真 美、村田以和夫、諸角聖、 山田堅一郎、高崎智彦、 倉根一郎	デングウイルス初感染例に おける中和抗体測定による 血清型判定が可能な病日期 間の検討.	臨床ウイルス.	32	30-35	2004
高崎智彦、倉根一郎	ウエストナイル熱.	日本医事新報	420 0	24-27	2004
西條政幸、森川茂、倉根 一郎	クリミア・コンゴ出血熱	ウイルス	54	223-228	2004
新井 智、多屋馨子、岡 部信彦、高崎智彦、倉根 一郎	わが国における日本脳炎の 疫学と今後の対策について	臨床とウイルス	32	13-22	2004
森田公一	日本脳炎、その他の脳炎ウ イルス	今日の治療指針 2004		143-144	2004
森田公一	Nipah ウイルス感染症	化学療法の領域	20	187-190	2004
森田公一	西ナイル熱のワクチン	Medical Technology	32	347-348	2004
森田公一	新興・再興感染症に対する ワクチン「西ナイル熱」	総合臨床	53	1963-1967	2004
森田 公一	西ナイルウイルス感染症	臨床とウイルス	32	7-12	2004

森田公一	セントルイス脳炎	人獣共通感染症 (木村哲、喜田宏 偏)		84-85	2004
森田公一	ウエストナイル熱	人獣共通感染症 (木村哲、喜田宏 偏)		86-88	2004
森田公一	デング熱・デング出血熱	人獣共通感染症 (木村哲、喜田宏 偏)		89-91	2004
森田公一	カリフォルニア脳炎	人獣共通感染症 (木村哲、喜田宏 偏)		92-93	2004
森田公一	ウエストナイル熱・脳炎	日本内科学会誌	93	2328-2333	2004
森田公一	デング熱、デング出血熱	今日の治療指針 2005		143	2005
小西英二	日本脳炎ウイルス自然感 染率：ワクチン不要論は正 しいか？	臨床とウイルス	32	372-379	2005
江下優樹、高崎智彦、井 村俊郎、内田幸憲、 高島郁夫、倉根一郎	ウエストナイルウイルス とその媒介蚊	九州実験動物雑誌	20	31-39	2004
江下優樹、牛島廣治	日本脳炎以外のアルボウ ウイルス感染防止—特にウ エストナイル熱およびデ ング熱—	小児科診療	67	154-160	2004

分担研究報告書

クリミア・コンゴ出血熱ウイルス核蛋白検出 ELISA による
クリミア・コンゴ出血熱診断

分担研究者 森川 茂 （国立感染症研究所ウイルス第1部第1室室長）
協力研究者 西條政幸 （国立感染症研究所ウイルス第1部主任研究官）
倉根一郎 （国立感染症研究所ウイルス第1部部长）
唐 青 （中国ウイルス性疾患予防対策センター）

研究要旨：クリミア・コンゴ出血熱（Crimean-Congo hemorrhagic fever, CCHF）ウイルス（中国 8402 株）の核蛋白に対する単クローン抗体を作製し、それを捕捉抗体とした抗原検出 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, 以下 Ag-capture ELISA) を開発し、CCHF の診断における有用性を nested reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) と比較して検討した。20 名のそれぞれの急性期 CCHF 疑い患者から得られた血清 20 検体中、RT-PCR で陽性を示したのは 9 検体であった。Ag-capture ELISA で陽性を呈したものは 3 検体で、その 3 検体は RT-PCR でも陽性を呈した。RT-PCR で陽性を呈した検体 9 検体のうち、CCHF ウイルスに対する IgG 抗体および IgM 抗体ともに陰性であったものは 6 検体であり、そのうち 3 検体が Ag-capture ELISA が陽性であった。今回作製された単クローン抗体を用いた Ag-capture ELISA では、8402 株の核蛋白が検出される場合と同様の感度で CCHF ウイルス (IbAr10200 株) の核蛋白も検出された。今回開発された Ag-capture ELISA は、RT-PCR に比較して感度は劣るものの、急性期 CCHF の診断に有用と考えられる。

A. 研究目的

クリミア・コンゴ出血熱 (Crimean-Congo hemorrhagic fever, CCHF) は、ブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類される CCHF ウイルスによる感染症で、致死率の高いウイルス感染症の一つである。CCHF はエボラウイルス感染症などとともに、感染症新法（感染症の予防及び感染症患者に対する医療に関する法律）で 1 類感染症に分類される。ヒトは感染ダニ (*Hyalomma* 属) に咬まれたり、ウイルス血症を伴う感染動物（ヒツジなど）の血液や体液に接触したりして

CCHF ウイルスに感染する。また、ヒトからヒトへの感染もまれではなく、CCHF 患者の治療にあたった医療関係者が患者から CCHF ウイルスに感染する院内感染例も報告されている。さらに、抗 RNA ウイルス薬のひとつであるリバビリンが、CCHF の治療に有用であるとの報告もある。そのため、CCHF の迅速診断は、感染拡大の防止や治療に重要である。

国立感染症研究所ウイルス第1部では、これまで感染性 CCHF ウイルスを用いることなく CCHF の診断を下せるよう CCHF ウイ

ルスの組換え核蛋白を抗原とした血清学的診断システムを開発してきた。本研究では、さらに組換え核蛋白に対する単クローン抗体を作製し、それを捕捉抗体とした抗原検出 enzyme-linked immunosorbent assay (Ag-capture ELISA) を開発し、その CCHF の診断における有用性を急性期の CCHF 患者から得られた血清を用いて評価した。

B. 研究方法

- 1) ウイルス: CCHF ウイルス中国/66019 株, 7001 株, 75024 株, 7803 株, 8166 株, 8402 株を用いた。乳飲み子マウスの脳内にウイルスを接種して増殖させた。尚, 感染性 CCHF ウイルスを扱う研究は, 中国流行病微生物学研究所 (現中国ウイルス性疾患予防センター) の高度安全研究施設内で行われた。
- 2) CCHF ウイルスの組換え核蛋白をコードする遺伝子: CCHF ウイルス中国/8402 株および Nigeria/IbAr10200 株の核蛋白の cDNA は, それぞれパスツール研究所 (フランス) および米国疾病予防センター特殊病原体部門より供与を受けた。
- 3) CCHF ウイルスの組換え核蛋白および分割された組換え核蛋白の作製: 先に報告した方法 (J Clin Microbiol 40:1587-1591, 2002) に従い, CCHF ウイルス中国/8402 株または Nigeria/IbAr10200 株の核蛋白の N-末端側にヒスチジンタグが付加された CCHF ウイルスの核蛋白を発現する組換えバキュロウイルスをそれぞれ作製した。その組換えバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させ, 組換え CCHF ウイルス核蛋白を発現させた。組換え CCHF ウイルス核蛋白は Ni²⁺カラムを用いて精製した。精製された蛋白濃度は, Bradford 方により決定した。また, CCHF ウイルスの核蛋白遺伝子の部分遺伝子を pGEX-2T ベクター (Pharmacia) に組み込み, CCHF ウイルス核蛋白の部分蛋白を発現させた。

- 4) 単クローン抗体の作製: 組換え CCHF ウイルス核蛋白を BALB/c ウイルスに 3 回免疫し, 脾臓を採取した。採取された脾臓から細胞を採取し, マウスミエローマ細胞 (P3/Ag568) と融合させて CCHF ウイルス核蛋白に対する単クローン抗体を分泌するハイブリドーマを樹立した。
- 5) 単クローン抗体のエピトープの決定: 作製された単クローン抗体の結合部位 (エピトープ) は, 分割された核蛋白に対する反応性を Western blot 法で調べて決定した。
- 6) 抗原検出 ELISA: 作製された単クローン抗体を捕捉抗体として, また, 捕捉された核蛋白の検出抗体として当研究室で作製された抗 CCHF ウイルス核蛋白ウサギ抗体を用いて, 先の報告 (J Clin Microbiol 39:3267-3271, 2001) に従い Ag-capture ELISA を開発した。
- 7) CCHF ウイルスに対する抗体検出: CCHF ウイルスの組換え核蛋白を抗原とした抗体検出システムを用いて CCHF ウイルスに対する抗体を検出した (J of Clin Microbiol 40:1587-1591, 2001 ; Journal of Medical Virology 75:295-299, 2005)。
- 8) RT-PCR: 血清中の CCHF ウイルス部分 S-遺伝子は, 先の報告に従い検出した (Clin Diagn Lab Immunol 10:489-491, 2003)。

C. 結果

- 1) 作製された単クローン抗体を用いた Ag-capture ELISA の組換え CCHF ウイルス核蛋白および CCHF ウイルス中国/66019 株の検出。CCHF ウイルス核蛋白に対する単クローン抗体を分泌するハイブリドーマは, 10 クローン (1F5, 1F1, 2C4, 1B7, 1B8, 1E10, 3B6, 1E5, 2E10, 3F8) 樹立された。

それぞれの単クローン抗体を捕捉抗体とした Ag-capture ELISA の核蛋白検出感度を調べたところ、8 クローン (1F1, 2C4, 1B7, 1B8, 1E10, 3B6, 1E5, 2E10) のそれぞれの単クローン抗体を用いた Ag-capture ELISA により、4ng/ml の濃度の CCHF ウイルス (中国/8402 株) 核蛋白が検出された (図 1A)。その 8 クローンの内 1B8, 1E5, 3B6 を除く 5 クローンを用いた Ag-capture ELISA により、CCHF ウイルス中国/66019 株核蛋白がより高感度に検出された (図 1B, C)。

- 2) Ag-capture ELISA の CCHF ウイルス中国株の検出感度の比較：5 クローン (1F1, 2C4, 1B7, 1E10, 2E10) をそれぞれ用いた Ag-capture ELISA の CCHF ウイルス中国株の検出感度を比較した (図 2)。クローン 2E10 以外の単クローン抗体を用いた Ag-capture ELISA は、調べられた CCHF ウイルス中国株を高感度に検出した。そこでクローン 1B7 を用いた Ag-capture ELISA に関して以下の実験が行われた。
- 3) 単クローン抗体 1B7 のエピトープの決定：CCHF ウイルスの核蛋白は 482 個のアミノ酸からなる蛋白である。図 3 には、その分割された蛋白は翻訳開始コドンからのアミノ酸番号で表示されている。クローン 1B7 は、201-306 のほぼ 100 アミノ酸からなるペプチドと結合することが明らかとなった。データには示さないが、合成ペプチドを抗原としたペップスキャン解析によると、いずれのペプチドともクローン 1B7 は反応しなかった。これらの成績から、クローン 1B7 は構造的エピトープと結合する抗体であることが明らかになった。
- 4) 急性期の CCHF 患者から得られた血清

を用いた Ag-capture ELISA の有用性の検討：中国西部の CCHF 患者 20 名 (2001 年 8 人, 2002 年 12 人) から血清が採取され研究に供された。血清 20 検体中 9 検体からウイルスゲノムが RT-PCR による増幅された。そのうち 3 検体が Ag-capture ELISA で陽性を示した (図 4)。RT-PCR 陽性の 9 検体中、IgG, IgM 抗体ともに陽性であったものは 6 検体で、残りの 3 検体は IgG 抗体陰性、IgM 抗体陽性であった。Ag-capture ELISA で陽性を呈したのは、すべて IgG 抗体、IgM 抗体ともに陰性の検体であった。

- 5) Ag-capture ELISA の CCHF ウイルス 8402 株と IbAr10200 株の核蛋白の検出感度の比較：単クローン抗体 1B7 は、Western blot 法で CCHF ウイルス 8402 株と IbAr10200 株の核蛋白に結合し (図 5A)、また、単クローン抗体 1B7 を捕捉抗体とした Ag-capture ELISA により、両核蛋白は同等の感度で検出された (図 5)。

D. 考察

CCHF ウイルス抗原検出 ELISA は、過去に開発され、しかも、それは CCHF の診断に応用されている (J Virol Methods 42:33-44, 1993; Am J Trop Med Hyg 57:519-25, 1997)。その抗原検出 ELISA では、捕捉抗体として CCHF ウイルスに免疫されたヒツジの血清から精製されたヒツジ抗体が、検出用抗体として CCHF ウイルス免疫マウスの腹水が用いられている。その Ag-capture ELISA は、ダニに感染しているウイルス抗原を検出する場合にも有用であると報告されている。

今回、私たちが開発した CCHF ウイルス核蛋白に対する単クローン抗体を捕捉抗体とした Ag-capture ELISA の報告は、CCHF ウイルス抗原捕捉 ELISA の報告としては 2 番目のもので、単クローン抗体を捕捉抗体と

した ELISA の報告としては初めてのものである。

私たちは、今回開発された Ag-capture ELISA の CCHF の診断における有用性を実際の患者から得られた血清を用いて評価した。CCHF ウイルスに対する抗体出現前の患者血清の 50% が、この Ag-capture ELISA で陽性を示した。確かに、nested RT-PCR の感度に比較すると、nested RT-PCR 法では IgM 抗体が出現している時期の患者から得られた血清からも、ウイルス遺伝子が増幅されていることから、Ag-capture ELISA は nested RT-PCR よりも感度は低く、この方法だけでは CCHF の診断には不十分であろう。しかし、CCHF の診断には single round RT-PCR では CCHF ウイルス遺伝子を増幅して検出することはできず (未発表), そのため RT-PCR による診断においては偽陽性の成績を呈する可能性もある。

データは示していないが、抗 CCHF ウイルス抗体は Ag-capture ELISA における捕捉抗体の抗原との結合を阻害する。Ag-capture ELISA は、抗 CCHF ウイルス抗体の出現する前の急性期 CCHF の診断に有用と考えられる。

単クローン抗体 1B7 は、CCHF ウイルス核蛋白の抗原性の強いほぼ中心部の 100 アミノ酸からなるペプチドの構造を認識する。単クローン抗体 1B7 は中国 8402 株の核蛋白に対する抗体であるが、Nigeria 株の核蛋白とも結合する。今回開発された Ag-capture ELISA は、中国株のみならず中近東やアフリカに分布する CCHF ウイルスの核蛋白をも検出できると推測される。

E. 結語

CCHF ウイルス核蛋白に対する単クローン抗体 1B7 を作製した。それを捕捉抗体とした Ag-capture ELISA を開発し、CCHF の診断における有用性を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. (2004) Possible horizontal transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus from a mother to her child. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 57:55-57.
- 2) Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Modification of endothelial cell functions by hantaan virus infection: prolonged hyper-permeability induced by TNF-alpha of hantaan virus infected endothelial cell monolayers. *Archives of Virology* 149. 1279-92.
- 3) Mizitani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Phosphorylation of p38 MAPK and its downstream targets in SARS coronavirus-infected cells. *Biochemical Biophysical Research Communication* 319: 1228-1234.
- 4) Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Importance of Akt signaling pathway for apoptosis in SARS-CoV-infected Vero E6 cells. *Virology* 327: 169-74.
- 5) Mizutani T, Fukushi S, Murakami M, Hirano T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. (2004) Tyrosine dephosphorylation of STAT3 in SARS coronavirus-infected Vero E6 cells. *FEBS letter* 5;577(1-2):187-92
- 6) Takasuka N, Fujii H, Takahashi Y, Kasai M, Morikawa S, Itamura S, Ishii

- K, Sakaguchi M, Ohnishi K, Ohshima M, Hashimoto SI, Odagiri T, Tashiro M, Yoshikura H, Takemori T, Tsunetsugu-Yokota Y. (2004): A subcutaneously injected UV-inactivated SARS coronavirus vaccine elicits systemic humoral immunity in mice. *Int Immunol.*, 16(10): 1423-30
- 7) Iwasaki, T., Inoue, S., Tanaka, K., Sato, Y., Morikawa, S., Hayasaka, D., Moriyama, M., Ono, T., Kanai, S., Yamada, A. and Kurata, T. (2004): Characterization of Oita virus 296/1972 of Rhabdoviridae isolated from a horseshoe bat bearing characteristics of both lyssavirus and vesiculovirus. *Arch. Virol.*, 149(6): 1139-1154.
- 8) Saijo M, Tang Q, Shimayi B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. (2005) Recombinant nucleoprotein-based serological diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections. *Journal of Medical Virology* 75:295-299
- 9) Okada M, Takemoto Y, Okuno Y, Hashimoto S, Yoshida S, Fukunaga Y, Tanaka T, Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y, Kanamaru N, Takai H, Okada C, Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K, Matsumoto M, Kase T, Demello D.E., Peiris JSM, Chen P.J., Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M.: (2005) The Development of vaccines against SARS Corona Virus in Mice and SCID-PBL/hu Mice. *Vaccine* (in press).
- 10) Saijo, M., Ogino, T., Taguchi, F., Fukushi, S., Mizutani, T., Notomi, T., Kanda, H., Minekawa, H., Matsuyama, S., Hoang Thuy Long, Nguyen Thi Hong Hanh, Kurane, I., Tashiro, M., Morikawa, S.. (2005): Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. *J. Virol. Methods* (in press)
- 11) Saijo, M., Niikura, M., Maeda, A., Kurane, I., Sata, T., Kurata, T., and Morikawa, S. (2005): Characterization of monoclonal antibodies to Marburg virus nucleoprotein (NP) that can be used for NP-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Med. Virol.*, (in press)
- 12) 森川 茂 (2004): ウイルス性出血熱、アニムス、第9巻第1号、15-20
- 13) 小田切孝人, 二宮愛, 板村繁之, 西藤岳彦, 宮島直子, 森川茂, 西條政幸, 田代真人 (2004): SARS 診断法の開発と SARS 検査の結果. *インフルエンザ (メディカルレビュー社)* 5:35-42.
- 14) 森川 茂 (2004): サル痘、感染症の事典、朝倉書店、pp107-109
- 15) 森川 茂 (2004): ラッサ熱、獣医公衆衛生学 (第3版)、文永堂出版、pp91-92
- 16) 森川 茂 (2004): 南米型出血熱、獣医公衆衛生学 (第3版)、文永堂出版、pp92-93
- 17) 森川 茂 (2004): ニパウイルス感染症、家庭医学大全科、法研、pp2770
- 18) 森川 茂 (2004): リンパ球性脈絡髄膜炎、共通感染症ハンドブック、日本獣医師会、pp230-231
- 19) 森川 茂 (2004): マールブルグ病、感染症の診断・治療ガイドライン 2004、日本医師会、pp78-79

- 20) 森川 茂 (2004) : サル痘、感染症の診断・治療ガイドライン 2004、日本医師会、pp144-145
- 21) 森川 茂 (2004) : ニパウイルス感染症、感染症の診断・治療ガイドライン 2004、日本医師会、pp128-129
- 22) 森川茂 (2004) : サル痘、新興再興感染症—SARS の教訓 [からだの科学 (増刊)] 日本評論社、pp188-191
- 23) 森川茂 (2004) : 天然痘ワクチンの復活 小児科臨床 (特大号/ワクチンのすべて) 67 : 11
- 24) 西條政幸, 森川茂, 倉根一郎. (2004) クリミア・コンゴ出血熱. ウイルス 54:223-228.
2. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む) 特許取得 : 該当なし
3. 学会発表
- 1) Saijo M, Tang Q, Kurane I, Morikawa S. Molecular epidemiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infections in the Xinjiang Uygur Autonomous Region, P. R. China. 5th Japan-China Virology Conference. June, 2004, Osaka
- 2) Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Modification of endothelial cell functions by Hantaan virus infection: prolonged heperpermiability induced by TNF-alpha of Hantaan virus-infected endothelial cell monolayers. International Conference on Hantavirus infections. June 2004, Seoul, South Korea
- 3) 山田靖子, 水谷哲也, 高橋一朗, 福士秀悦, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoV の継代培養による変異ウイルスの出現. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 4) 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 福士秀悦, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎. マウスとラットを用いた SARS-CoV 感染モデルの作製. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 5) 西條政幸, 福士秀悦, 荻野利夫, 田口文広, 水谷哲也, 松山州徳, 倉根一郎, 田代真人, 森川茂. SARS コロナウイルスの組換え核蛋白を抗原とした ELISA 法の開発を評価. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 6) 森川茂, 長谷川秀樹, 西條政幸, 前田秋彦, 倉根一郎, 尾崎泰子, 佐多徹太郎, 倉田毅, 小島朝人. ワクチニアウイルス LC16m8 株の有効性と遺伝子構造の解析. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 7) 西條政幸, 網康至, 永田典代, 須崎百合子, 緒方もも子, 福士秀悦, 水谷哲也, 長谷川秀樹, 岩田奈織子, 佐多徹太郎, 倉根一郎, 倉田毅, 森川茂. LC16m8 株痘そうワクチンによるカニクイザルにおけるサル痘発症予防効果. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 8) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. ACE2 発現細胞を用いた SARS コロナウイルス感染の検討. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 9) 水谷哲也, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoV 感染細胞におけるアポトーシスに関するシグナル伝達系の網羅的検討. 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 2004 年 11 月, 横浜
- 10) 水谷哲也, 福士秀悦, 村上正晃, 西條政幸, 倉根一郎, 平野俊夫, 森川茂. SARS コロナウイルスの感染に誘導されるシ

グナル伝達の解析. 第 27 回日本分子生物学会年会. 2004 年 12 月, 神戸
11) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 倉根一郎, 西條政幸, 森川茂. Efficient

replication of SARS coronavirus on the cells expressin mouse ACE2. 第 27 回日本分子生物学会年会. 2004 年 12 月, 神戸

図 1. 各単クローンを捕捉抗体とした Ag-capture ELISA の組換え CCHF ウイルス核蛋白 (A) および CCHF ウイルス中国/66019 株の検出 (B)

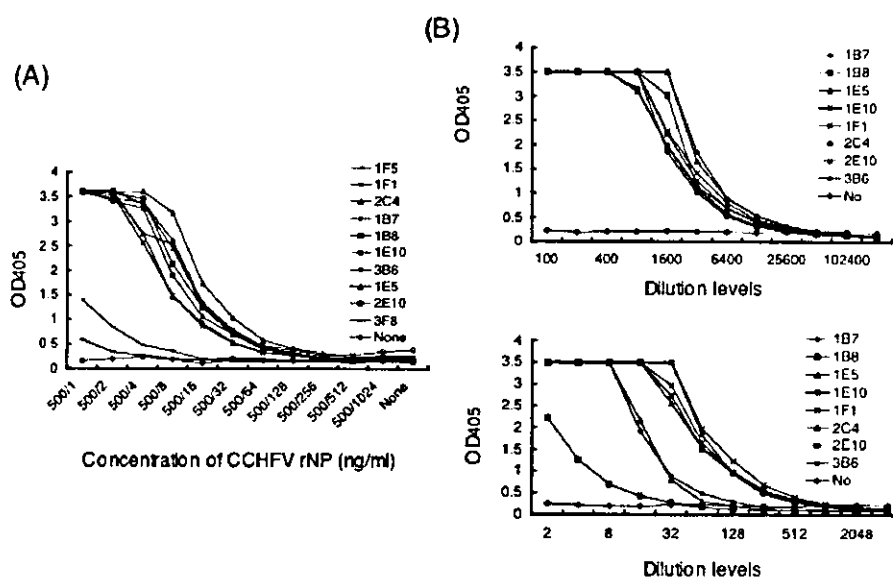


図 2. 各単クローンを捕捉抗体とした Ag-capture ELISA の CCHF ウイルス中国株の検出

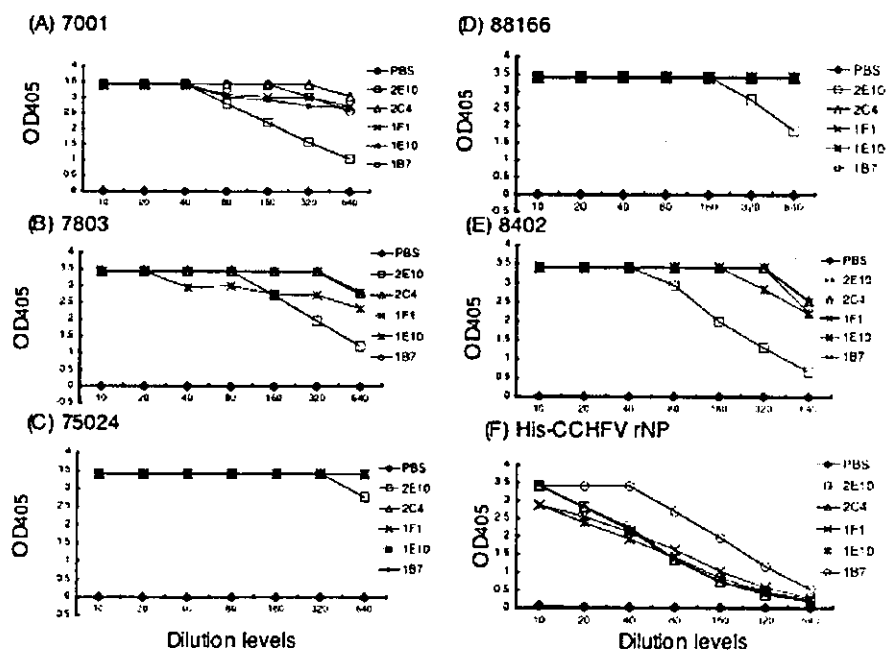


図3. 単クローン抗体 1B7 の Western blot 法による CCHF ウイルス核蛋白の結合部位の決定. CCHF ウイルス核蛋白の翻訳開始コドンに基づき、分割されたペプチドのアミノ酸番号を示している. アミノ酸部位 97-306 のアミノ酸配列を (D) に示し、下線部が 201-306 のアミノ酸配列で、単クローン抗体 1B7 の認識部位である.

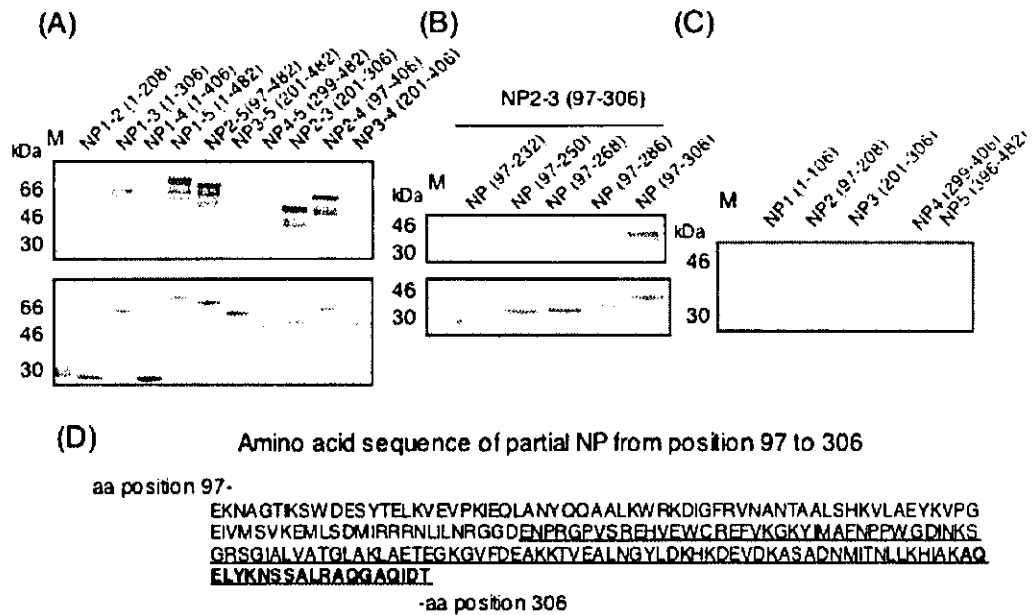


図4. CCHF 患者から採取された血清中からの CCHF ウイルス S-遺伝子部分遺伝子の増幅および Ag-capture ELISA の成績

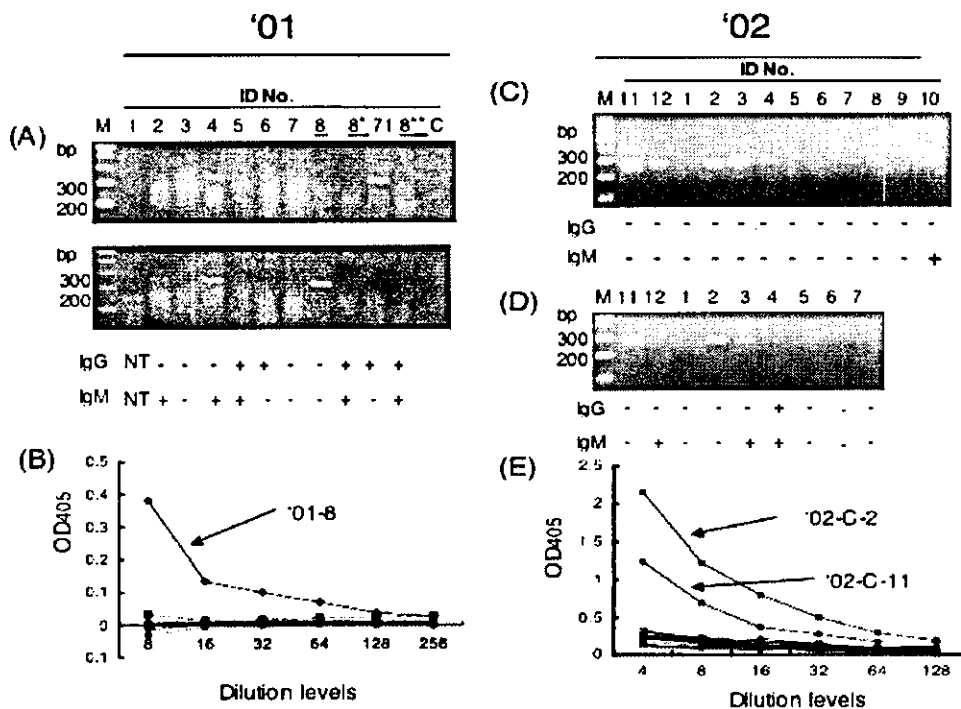


図 5. 単クローン抗体 1B7 の 8402 株と IbAr10200 の核蛋白に対する Western blot 法 (A) と Ag-capture ELISA (B) における反応性.

